

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

0001

JP00/04182

#2

日本国特許庁

26.06.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

EU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 6月25日

REC'D 11 AUG 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第180158号

WIPO PCT

出願人  
Applicant(s):

テルモ株式会社

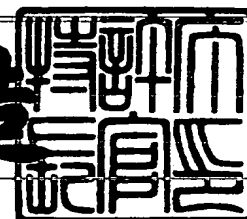
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058440

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 P990012100  
 【提出日】 平成11年 6月25日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 A61K 9/127  
 【請求項の数】 13  
 【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地  
 テルモ株式会社内

【氏名】 近藤 真代

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地  
 テルモ株式会社内

【氏名】 張替 貴志

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地  
 テルモ株式会社内

【氏名】 木村 順治

【特許出願人】

【識別番号】 000109543

【氏名又は名称】 テルモ株式会社

【代表者】 和地 孝

【電話番号】 0465-81-4171

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 018452

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

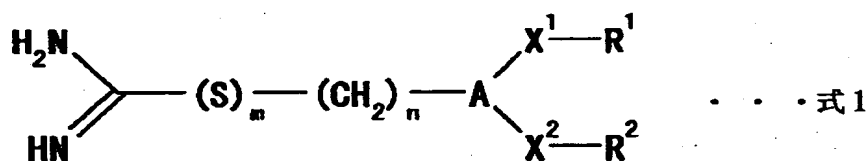
【発明の名称】 リポソーム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、および③他のリポソーム構成成分からなるリポソーム。

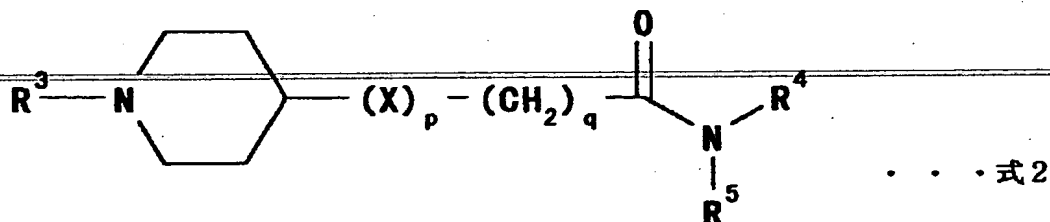
【請求項 2】 治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリポソームであって、構成成分として、①下記式 1 から 4 のいずれかに示される塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、および③他のリポソーム構成成分からなる請求項 1 に記載のリポソーム。

【化 1】



(式 1 中、A は芳香環を表す。R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は炭素数 10 ～ 25 のアルキル基またはアルニケル基を表し、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同一であっても異なってもよい。X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は -O-、-S-、-COO-、-OCO-、-CONH- または NHCO- を表し、X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は同一であっても異なってもよい。m は 0 または 1、n は 0 または 1 ～ 6 の整数を表す。)

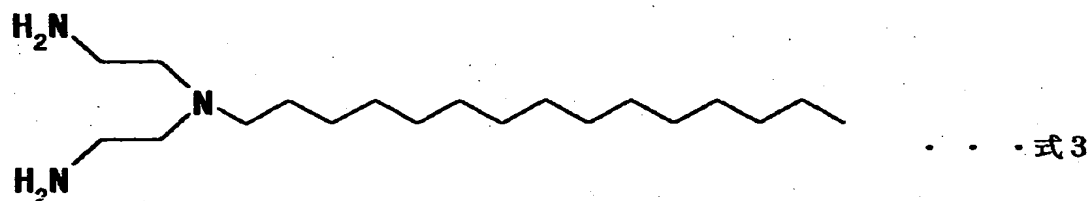
【化 2】



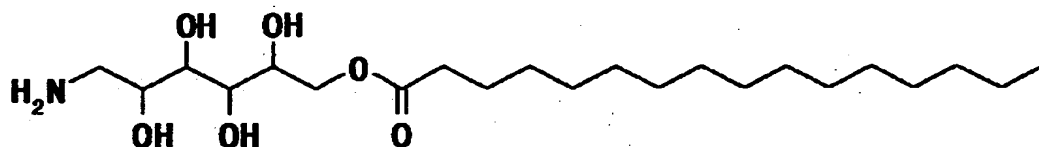
(式 2 中、R<sup>3</sup> は水素または炭素数 1 ～ 8 のアルキル基もしくはアルニケル基を

表す。 $R^4$ および $R^5$ は水素または炭素数1～25のアルキル基もしくはアルニケル基を表し（但し、 $R^4$ および $R^5$ が共に水素である場合を除く。）、 $R^4$ および $R^5$ は同一であっても異なってもよい。 $X^3$ は $-O-$ または $-S-$ を表す。 $p$ は0または1、 $q$ は0または1～10の整数を表す。）

【化3】



【化4】



. . . 式4

【請求項3】 pH酸性領域下で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積する請求項1乃至2に記載のリボソーム。

【請求項4】 pHが5～7で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積する請求項1乃至3に記載のリボソーム。

【請求項5】 前記リン酸モノエステル誘導体が、リン酸プレドニゾロン、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸である請求項1乃至4に記載のリボソーム。

【請求項6】 前記脂肪酸が、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸である請求項1乃至4に記載のリボソーム。

【請求項7】 前記他のリボソーム構成成分が、前記塩基性化合物および前記酸性化合物を除く、リン脂質あるいはその誘導体、および／またはリン脂質以外の脂質あるいはその誘導体、および／または安定化剤、および／または酸化防止剤、および／またはその他の表面修飾剤である請求項1乃至請求項6に記載のリボ

ソーム。

【請求項 8】前記診断および／または治療するための薬物が、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、酵素阻害剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメディエーターの遊離抑制剤、血管内皮細胞の増殖または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、NOS阻害剤、AGEs阻害剤あるいはラジカルスカベンジャーである請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【請求項 9】前記診断および／または治療するための薬物が、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体である請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【請求項 10】前記診断および／または治療するための薬物が、グリコサミノグリカンおよびその誘導体である請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【請求項 11】前記診断および／または治療するための薬物が、オリゴおよび／または多糖、およびそれらの誘導体である請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【請求項 12】前記診断および／または治療するための薬物が、タンパク質またはペプチドである請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【請求項 13】前記診断および／または治療するための薬物が、X線造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等の各種体内診断薬である請求項 1 乃至請求項 7 に記載のリボソーム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、薬物を内包するリボソームに関するものである。



## 【0002】

## 【従来の技術】

近年、薬物を効率よく目的臓器へ分布させるドラッグデリバリーシステム（D S）の研究が盛んになってきている。例えば、リポソーム、エマルジョン、リピッドマイクロスフェア、ナノパーティクルなどの閉鎖小胞を薬物運搬体として利用する方法、高分子合成ポリマーミセルや多糖体等の高分子運搬体に薬物を包みまたは結合させる方法、これら閉鎖小胞や高分子運搬体に抗体、蛋白質等の高分子機能性分子や、特定の糖鎖、ペプチド等の低分子機能性分子で表面を修飾して標的指向性を高める方法などが挙げられる。しかしながら、これら薬物運搬体の実用化に際しては、克服すべき様々な問題点があり、中でも生体側の異物認識機構からの回避や、体内動態の制御の困難さが問題となっている。特に閉鎖小胞は、血液中のオプソニン蛋白質や血しょう蛋白質との相互作用による凝集や、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織（R E S）での捕捉のため、標的とする組織や細胞への選択性の高い送達が困難な状況であった。

## 【0003】

しかし、これら閉鎖小胞をはじめとする高分子運搬体の表面をポリエチレングリコール（P E G）等の親水性高分子で被覆することにより、血しょう蛋白やオプソニン蛋白質などの吸着を防止して血中安定性を高め、R E Sでの捕捉を回避することが可能となってきた。一方、上記の修飾に基づいた閉鎖小胞が、R E Sを回避する性質を得た場合、リポソームと標的組織との相互作用が低下する。これにより病態組織における細胞による閉鎖小胞の取り込みの効率が低下しその結果該閉鎖小胞に封入された薬物の送達の効率が低下したり、血液中の蛋白などの生体成分との相互作用により引き起こされるリポソームの崩壊が抑制されその結果該閉鎖小胞に封入された薬物の放出速度が低下するなどの弊害がある。

## 【0004】

これら問題を解決するため、各種の環境応答性薬物運搬体、すなわち疾病に起因する環境変化、または、正常組織と病巣部位の環境の相違に応答して性質が変化する薬物運搬体が検討されている。例えば、炎症をはじめとする多くの病巣部位では局所のp Hの低下が知られているが（V.Menkin, Bi chemical Mechanism i

n Inflammation, Thomas, Springfield, III, pp.69-7(1956))、このような病変部位でのpH変化による環境に応答する標的指向を目的とした検討が試みられているが実用化に至っていない(Biochim Biophys Acta,1329(2),291-301(1997)、FEBS,421(1),61-4(1998))。とりわけpHの変化に応答し、その標的指向性が向上する薬物運搬体の報告はされていない。

#### 【0005】

従って、薬物、DNA、ペプチドおよびタンパク質を目的の部位、例えば肺ガン、肝ガン、腎ガン、膵ガン、肺炎、肝炎、腎炎、リンパ腫、血管内皮損傷部位などの病巣部位に確実に、効率良くかつ安全に薬物のターゲッティングが行え、DDS療法に有効な薬物運搬体の開発が強く望まれている。

#### 【0006】

一方、各種の塩基性化合物を膜状に含むいわゆるカチオン化リポソームは陰性荷電を持つ物質との親和性を持つが、特に細胞表面には、ヘパラン硫酸などの硫酸化多糖類の様な陰性電荷の物質により構成されるため、カチオン化リポソームは細胞膜との親和性が強いことが期待される。しかし、このようなカチオン化リポソームは、血液中に投与されると、血清中のタンパク質や赤血球膜表面などの陰性荷電の物質と結合してしまうため、その表面電荷が変化してしまうか、あるいは、血中で凝集を起こしてしまい、カチオン化リポソームの性能が失われてしまうことが問題とされていた

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来の標的指向性薬物運搬体の欠点を克服し、任意の環境変化に応答する標的指向性薬物運搬体を提供するためになされたものである。すなわち、本発明の目的は、薬物、DNA、ペプチドおよびタンパク質を病巣部位におけるpH変化により速やかに標的指向性能を発揮するリポソームを提供することである。本発明のリポソームは、炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位に特異的に集積し、また、標的部位以外では集積しない結果、副作用の軽減などの効果が期待される。

【0008】

さらに、本発明のリボソームは、循環血液中のような生理的 pH 条件では、陰性電荷の物質との相互作用は弱く、そのため、細胞やタンパク質などとの相互作用は少ないため、血液中でも安定であるが、炎症部位や腫瘍部位などの pH が低下した標的部位では、陰性荷電の物質との相互作用が増強されて、細胞親和性が向上し、標的部位に特異的に集積する。また、標的部位以外では集積しない結果副作用の軽減などの効果が期待される。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記課題は以下の本発明により解決される。

(1) 本発明は、治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリボソームであって、構成成分として、①塩基性化合物、②酸性化合物、および③他のリボソーム構成成分からなるリボソームである。

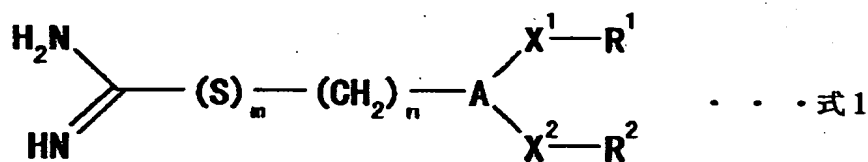
(2) 本発明は、治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリボソームであって、構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、および③他のリボソーム構成成分からなる上記(1)に記載のリボソームである。

【0010】

(3) 本発明は、治療および/または診断を目的とする薬物を内包するリボソームであって、構成成分として、①下記式 1 から 4 のいずれかに示される塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、および③他のリボソーム構成成分からなる上記(1)乃至(2)に記載のリボソームである。

【0011】

【化5】

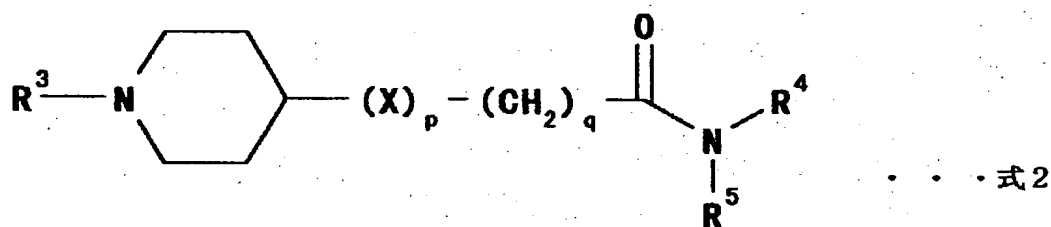


【0012】

(式1中、Aは芳香環を表す。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は炭素数10～25のアルキル基またはアルニケル基を表し、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同一であっても異なってもよい。X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>は-O-、-S-、-COO-、-OCO-、-CONH-またはNHCO-を表し、X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>は同一であっても異なってもよい。mは0または1、nは0または1～6の整数を表す。)

【0013】

【化6】

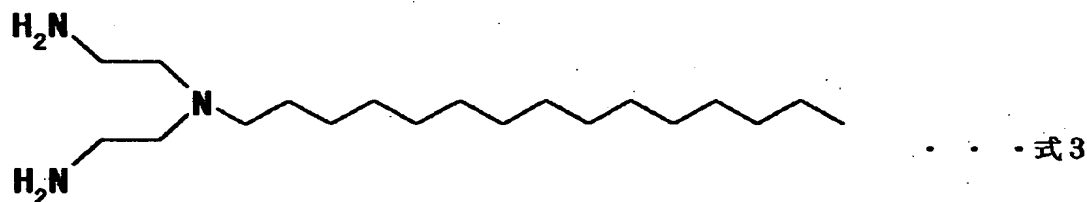


【0014】

(式2中、R<sup>3</sup>は水素または炭素数1～8のアルキル基もしくはアルニケル基を表す。R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は水素または炭素数1～25のアルキル基もしくはアルニケル基を表し(但し、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>が共に水素である場合を除く。)、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は同一であっても異なってもよい。X<sup>3</sup>は-O-または-S-を表す。pは0または1、qは0または1～10の整数を表す。)

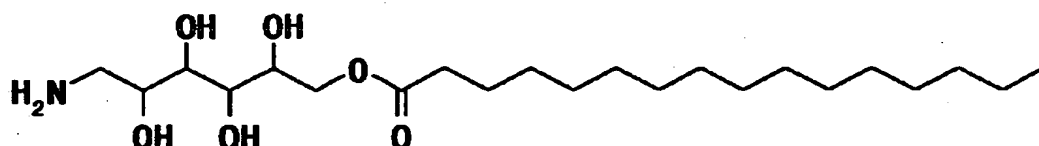
【0015】

【化7】



【0016】

【化8】



【0017】

(4) 本発明は、pH酸性領域下で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積する上記(1)乃至(3)に記載のリポソームである。

(5) 本発明は、pHが5～7で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積する上記(1)乃至(4)に記載のリポソームである。

(6) 本発明は、前記リン酸モノエステル誘導体が、リン酸ブレドニゾロン、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸である上記(1)乃至(5)に記載のリポソームである。

【0018】

(7) 本発明は、前記脂肪酸が、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸である上記(1)乃至(6)に記載のリポソームである。

(8) 本発明は、前記他のリポソーム構成成分が、前記塩基性化合物および前記酸性化合物を除く、リン脂質あるいはその誘導体、および/またはリン脂質以外の脂質あるいはその誘導体、および/または安定化剤、および/または酸化防

止剤、および／またはその他の表面修飾剤である上記（１）乃至（６）に記載のリポソームである。

【００１９】

（９）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、酵素阻害剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメデイエーターの遊離抑制剤、血管内皮細胞の増殖または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リポキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、ＮＯＳ阻害剤、ＡＧＥｓ阻害剤あるいはラジカルスカベンチャーである上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

【００２０】

（１０）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体である上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

（１１）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、グリコサミノグリカンおよびその誘導体である上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

【００２１】

（１２）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、オリゴおよび／または多糖、およびそれらの誘導体である上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

（１３）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、タンパク質またはペプチドである上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

（１４）本発明は、前記診断および／または治療するための薬物が、Ｘ線造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等の各種体内診断薬である上記（１）乃至（８）に記載のリポソームである。

## 【0022】

本発明のリポソームには、親水性高分子の脂質誘導体を必要に応じ加えることができ、その分子量は、1000～7000が望ましい。前記親水性高分子の脂質誘導体としては、ポリエチレングリコール誘導体が望ましく、特にポリエチレングリコール鎖とジアシルグリセロールを一分子内に含む化合物が望ましい。

## 【0023】

## 【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態について説明する。本発明のリポソームの構成成分は、それ単独で、膜に埋め込まれたときには、生理的 pH 条件下では膜に正電荷を与えるが、塩基性側では解離が抑制されて正電荷を失うような塩基性化合物と、それ単独で膜に埋め込まれたときに塩基性側では陰電荷を持つが、生理的 pH 付近から酸性側では解離が抑制されて陰電荷が減少するような酸性化合物と、その他のリポソーム構成成分からなり、小球状の構造を形成し、かつ安全性があれば特に限定せず使用することができる。

## 【0024】

ここで、生理的 pH 条件とは、生体内の pH、すなわち 7.4 前後、概ね 7.2 から 7.6 の範囲である。塩基性側とは、これよりの高い pH 領域を示す。多くのカチオン化リポソームに用いられる塩基性化合物は、膜に単独に埋め込まれた場合生理的 pH 条件で塩基性を示す。しかしながら、これらのうち、塩基性側でも解離が抑制されないような脂質では、pH 応答性が期待されない。例えば、4 級アンモニウム塩を含むような塩基性脂質は、塩基性側でも解離が抑制されないため、当該塩基性脂質に含まれない。一方で、生理的 pH 付近より酸性側とは、pH 7.4 付近より酸性側、概ね pH 6～8 の範囲より酸性側を指す。この領域から解離が抑制される酸性化合物であれば塩基性化合物との組み合わせにより性能を発揮することが期待される。しかし、pH 4 以下のような極端な酸性領域でのみ解離が抑制される化合物、例えばリン酸ジエステル誘導体などはこのような作用を持たないため、本発明の酸性化合物には含まれないことは後述する実施例により明らかにされる。

【0025】

具体的な本発明のリポソームの構成成分として、上記式1から4のいずれかに示される塩基性化合物、およびリン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、およびその他のリポソーム構成成分があげられ、小球状の構造を形成し、かつ安全性があるものであれば特に限定せず使用することができる。

【0026】

上記式1から4のいずれかに示される塩基性化合物としては、どれも適選使用できるが、特に、アミジン誘導体、ピペリジン誘導体、1級アミン誘導体、2級アミン誘導体、3級アミン誘導体などが望ましい。

【0027】

リン酸モノエステル誘導体としては、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されない。具体的には、リン酸プレドニソロンなどのステロイドのリン酸エステル、リン酸リボフラビン、ホスファチジン酸などがあげられる。特に、リン酸モノエステル誘導体の酸性化合物は、pH酸性領域下で、炎症部位や腫瘍部位などの病巣部位に特異的に集積するため、本発明のリポソームの構成成分として望ましい。

【0028】

脂肪酸としては、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されない。具体的には、天然または合成の、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、リノレン酸等があげられる。

【0029】

なお、本発明においては、必須構成成分であるリン酸モノエステル誘導体または脂肪酸の存在下であれば、ホスファチジルコリンなどのリン酸ジエステル化合物を含んでもよい。

【0030】

前記塩基性化合物および前記酸性化合物を除く、他のリポソーム構成成分としては、以下のものがあげられる。リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィアングオミエリ



ン、カルジオリピン等の天然または合成のリン脂質、これらを常法に従って水素添加したものが挙げられる。

#### 【0031】

安定化剤としては、例えば、膜流動性を低下させるコレステロール等のステロール、グリセロール、シュクロース等の糖類が挙げられる。酸化防止剤は、例えば、トコフェロール同族体、即ち、ビタミンEが挙げられる。トコフェロールには $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ および $\delta$ の4個が異性体で存在するが、本発明にはいずれも用いることができる。

#### 【0032】

親水性高分子の脂質誘導体は、リボソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、合成ポリアミノ酸、アミロース、アミロペクチン、キトサン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナン、及びこれらの誘導体が挙げられる。中でもポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコール誘導体が望ましい。

#### 【0033】

親水性高分子の脂質誘導体の分子量は、1000~7000であるのが好ましい。特に分子量1000~7000のポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコール誘導体は、血中滞留性を向上させる効果が顕著であり、好ましい。ポリエチレングリコール誘導体は、特に限定されないが、ポリエチレングリコール鎖とジアシルグリセロールを一分子内に有する化合物であるのが望ましい。

#### 【0034】

リボソーム表面を親水性高分子により修飾するには、様々な方式が挙げられ、特に限定されないが、前記親水性高分子を長鎖脂肪族アルコール、ステロール、  
ポリオキシプロピレンアルキル、またはグリセリン脂肪酸エステル、リン脂質等  
の疎水性化合物と結合させて、前記疎水性化合物の部分のリボソーム表面へ挿入  
する方式が好ましい。

【0035】

なお、前記親水性高分子の脂質誘導体以外の表面修飾剤を併用することもできる。親水性高分子以外の表面修飾剤は、例えば、グルクロン酸、シアル酸等の水溶性多糖類が挙げられる。

【0036】

診断および／または治療の薬物は、目的に応じて、薬学的に許容し得る薬理的活性物質、生理的活性物質および／または診断用物質を用いることができる。薬物の種類としては、リポソームの形成を損なうものでなければ特に限定されない。

【0037】

具体的には、抗癌剤、抗生物質、酵素剤、抗酸化剤、脂質取り込み阻害剤、ホルモン剤、抗炎症剤、ステロイド剤、血管拡張剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗剤、平滑筋細胞の増殖・遊走阻害剤、血小板凝集阻害剤、抗凝固剤、ケミカルメデイエーターの遊離阻害剤、血管内皮細胞の増殖促進または抑制剤、アルドース還元酵素阻害剤、メサングウム細胞増殖阻害剤、リボキシゲナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、メイラード反応抑制剤、アミロイドーシス阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤、Advanced glycation endproducts阻害剤、ラジカルスカベンジャー、タンパク質、ペプチド、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝子およびその類縁体などが挙げられる。

【0038】

例えば、抗癌剤の例としては、シクロホスファミド、イホスファミド、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、チオテパ、ブルスファン、カルボコン、塩酸ニムスチン、ラニムスチン、メルファラン、トシル酸インプロスルファン、ダカルバジン、塩酸プロカルバジン、シタラビン、シタラビンオクスファート、エノシタビン、メルカプトプリン、チオイノシン、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、テガフル、メトトレキサート、カルモフル、ヒドロキシカルバミド、硫酸ピンクリスチン、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンデシン、エトポシド、クロモマイシンA3、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アラクルビシン、ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ダクチノマイシン、塩酸ミトキサ

ントロン、塩酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、マイトマイシンC、ネオカルノスタチン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトンミトプロニトール、デキストラン硫酸ナトリウム、酢酸オクトレオチド、シスプラチン、カルボプラチン、クエン酸タモキシフェン、酢酸メドロキシプロゲステロン、リン酸エストラムスチンナトリウム、酢酸ゴセリン、酢酸リユープロレリン、塩酸イリノテカンなどが挙げられる。

【0039】

抗生物質の例としては、ベンジルペニシリンカリウム、ベンジルペニシリンベンザチン、フェノキシメチルペニシリンカリウム、フェネチシリンカリウム、クロキサシリンナトリウム、フルクロキサシリンナトリウム、アンピシリン、トシル酸スルタミシリン、塩酸バカンピシリン、塩酸タランピシリン、レナンピシリン、ヘタシリンカリウム、シクラシリン、アモキシシリン、塩酸ピブメシリナム、アスポキシシリン、カルベニシリンナトリウム、カリンダシリンナトリウム、スルベニシリンナトリウム、チカルシリンナトリウム、ピペラシリンナトリウム、セファロリジン、セファロチンナトリウム、セファゾリンナトリウム、セファピリンナトリウム、セフラジン、セファレキシン、セファトリジンプロピレングリコール、セフロキサジン、セファクロル、セファドロキシル、塩酸セフォチアム、塩酸セフォチアムヘキセチル、セフロキシムナトリウム、セフロキシムアキセチル、セファマンドールナトリウム、セフジニル、塩酸セフェタメトピボキシル、セフチブテン、セフメタゾールナトリウム、セフォキシチンナトリウム、セフォデタンナトリウム、セフミフクスナトリウム、セフペラゾンナトリウム、セフピラミドナトリウム、セフスロジンナトリウム、セフォタキシムナトリウム、セフォペラゾンナトリウム、セフチゾキシムナトリウム、塩酸セフメノキシム、セフトリアキソンナトリウム、セフタジジム、セフピミゾールナトリウム、セフィキシム、セフテラムピボキシル、セフゾナムナトリウム、セフボドキシプロキセチル、セフォジジム、硫酸セフピロム、ラタモキセフナトリウム、フロモキセフナトリウム、イミペネム、シラスタチンナトリウム、アズトレオナム、カルモナムナトリウム、硫酸ステレプトマイシン、硫酸カナマイシン、硫酸フラジオマイシン、硫酸アミカシン、硫酸ゲンタマイシン、硫酸パロモマイシン、硫酸ペ

カナマイシン、硫酸リポスタマイシン、硫酸ジベカシン、トブラマイシン、硫酸シソマイシン、硫酸ミスロノマイシン、硫酸アストロマイシン、硫酸ネチルマイシン、硫酸イセパマイシン、硫酸アルベカシン、エリスロマイシン、キタサマイシン、アセチルキタサマイシン、リン酸オレアンドマイシン、ジョサマイシン、アセチルスピラマイシン、ミデカマイシン、酢酸ミデカマイシン、ロキタマイシン、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン、塩酸テトラサイクリン、塩酸オキシテトラサイクリン、メタリン酸テトラサイクリン、塩酸デメチルクロルテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、塩酸ドキシサイクリン、塩酸ミノサイクリン、クロラムフェニコール、コハク酸クロラムフェニコールナトリウム、バルミチン酸クロラムフェニコール、チアンフェニコール、塩酸アミノ酢酸チアンフェニコール、硫酸コリスチン、コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム、硫酸ポリミキシンB、バシトラシン、塩酸バンコマイシン、塩酸リンコマイシン、クリンダマイシン、塩酸スペクチノマイシン、ホスホマイシンナトリウム、ホスホマイシンカルシウムなどが挙げられる。

#### 【0040】

酵素剤の例としては、キモトリプシン、結晶トリプシン、ストレプトキナーゼ・ストレプトドルナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ウロキナーゼ、ナサルプラーゼ、アルテプラーゼ、塩化リゾチーム、セミアルカリプロティナーゼ、セラペプターゼ、チソキナーゼ、デュテプラーゼ、バトロキソピン、プロナーゼ、プロメラインなどが挙げられる。

#### 【0041】

抗酸化剤の例としては、トコフェロール、アスコルビン酸、尿酸などが挙げられる。

#### 【0042】

抗炎症剤の例としては、サリチル酸コリン、サザピリン、サリチル酸ナトリウム、アスピリン、ジフルニサル、フルフェナム酸、メフェナム酸、フロクタフェニン、トルフェナム酸、ジクロフェナクナトリウム、トルメチンナトリウム、スリンダク、フェンブフェン、フェルピナクエチル、インドメタシン、インドメタシンファルネシル、アセメタシン、マレイン酸プログルメタシン、アンフェナクナ

トリウム、ナブメトン、イブプロフェン、フルルビプロフェン、フルルビプロフェンアキセチル、ケトプロフェン、ナプロキセン、プロチジン酸、プラノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、チアプロフェン酸、オキサプロジン、ロキソプロフェンナトリウム、アルミノプロフェン、ザルトプロフェン、フェニルブタゾン、クロフェゾン、ケトフェニルブタゾン、ピロキシカム、テノキシカム、アンピロキシカム、塩酸チアラミド、塩酸チノリジン、塩酸ベンジダミン、エピリゾール、エルモファゾンなどが挙げられる。

【0043】

ステロイド剤の例としては酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン（リン酸エステル、酢酸塩）、酪酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、プレドニゾン（アセテート、サクシネート、第三級ブチル酢酸エステル、リン酸エステル）、メチルプレドニゾン（アセテート）、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド（酢酸トリアムシノロン）、デキサメタゾン（リン酸エステル、酢酸塩、リン酸ナトリウム塩、硫酸エステル）、パルミチン酸デキサメタゾン、ベタメタゾン（リン酸塩、2ナトリウム塩）、酢酸パラメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸ハロプレドン、プロピオン酸クロベタゾール、ハルシノニド、プロピオン酸ベクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、酢酸ベタメタゾン、酢酸コルチゾンなどが挙げられる。

【0044】

アンジオテンシン変換酵素阻害剤の例としては、アラセプリル、塩酸イミダプリル、塩酸テモカプリル、塩酸デラプリル、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、シラザプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリルなどが挙げられる。

血管拡張剤の例としては、テオフィリン、ジプロフィリン、プロキシフィリン、~~アミノフィリン、コリンテオフィリン、プロスタグランジン、プロスタグランジン誘導体、~~アルプロスタジルアルファデクス、アルプロスタジル、リマプロストアルファデクス、パパベリン、シ克蘭デラート、シンナリジン、フマル酸ベンシ克蘭、マレイン酸シネバジド、塩酸ジラゼブ、トラピジル、塩酸ジフェニドール、ニコチン酸、イノシトールヘキサニコチネート、クエン酸ニカメタート、

酒石酸ニコチンアルコール、ニコチン酸トコフェロール、ヘプロニカート、塩酸イソクスプリン、硫酸バメタン、塩酸トラリゾン、メシル酸ジヒドロエルゴトキシン、酒石酸イフェンプロジル、塩酸モキシシリト、ニセルゴリン、塩酸ニカルジピン、ニルバジピン、ニフェジピン、塩酸ベニジピン、塩酸ジルチアゼム、ニソルジピン、ニトレンジピン、塩酸マニジピン、塩酸バルニジピン、塩酸エホニジピン、塩酸ベラパミル、塩酸トリメタジジン、カプトプリル、マレイン酸エナラプリル、アラセプリル、塩酸デラプリル、シラザプリル、リシノプリル、塩酸ベナゼプリル、塩酸ヒドララジン、塩酸トドララジン、ブドララジン、カドララジン、インダパミド、塩酸カルボクロメン、エフロキサート、塩酸エタフェノン塩酸オキシフェドリン、ニコランジル、亜硝酸アミル、硝酸イソソルビドなどが挙げられる。

【0045】

平滑筋細胞遊走・増殖抑制剤の例としては、ヘパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム（低分子ヘパリン）、ヘパリンカルシウム、デキストラン硫酸などが挙げられる。

【0046】

血小板凝集阻害剤の例としては、塩酸チクロピジン、シロスタゾール、イコサペント酸エチル、ベラプロストナトリウム、塩酸サルブグレラート、バトロキシビン、ジピリダモールなどが挙げられる。

【0047】

抗凝固剤の例としては、ヘパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム（低分子ヘパリン）、ヘパリンカルシウム、デキストラン硫酸、ワルファリンカリウム、アルガトロバンなどが挙げられる。

【0048】

ケミカルメディエーター遊離抑制剤の例としては、トラニラスト、フマル酸ケトフェチン、塩酸アゼラスチン、オキサトミド、アンレキサノクス、レピリナストなどが挙げられる。

【0049】

免疫抑制剤の例としては、シクロスポリンなどが挙げられる。

## 【0050】

抗ウイルス剤の例としては、アシクロビル、ガンシクロビル、ジダノシン、ジドブジン、ソリブジン、ビダラビンなどが挙げられる。

## 【0051】

また、封入する診断するための薬剤の種類としては、薬物担体の形成を損ねない限り特に限定されるものではない。具体的には、X線造影剤、放射性同位元素標識核医学診断薬、核磁気共鳴診断用診断薬等が挙げられる。

## 【0052】

例えば、X線造影剤の例としては、アミドトリゾ酸メグルミン、イオタラム酸ナトリウム、イオタラム酸メグルミン、ガストログラフィン、ヨードミドメグルミン、リビオドールウルトラフルイド、アジピオドンメグルミン、イオキサグル酸、イオトロクス酸メグルミン、イオトロラン、イオパノ酸、イオパミドール、イオヘキソール、イオベルソール、イオボダートナトリウム、イオメプロール、イソパーク、ヨードキサム酸などが挙げられる。

## 【0053】

本発明のリポソームは、常法によって容易に得ることができる。その一例を以下に示す。塩基性化合物、酸性化合物、およびその他のリン脂質、安定化剤、酸化防止剤等の構成成分を、フラスコ内のクロロホルム等の有機溶媒中で混合し、有機溶媒を留去した後、真空乾燥することによりフラスコ内壁に薄膜を形成させる。次に前記フラスコ内に薬物を加え、激しくかくはんすることにより、リポソーム分散液を得る。得られたリポソーム分散液を遠心分離し、上製をデカンテーションして封入されなかった薬物を除去する。必要に応じ、更に、親水性高分子の脂質誘導体の溶液を加えて加温することにより、本発明のリポソームが得られる。

## 【0054】

なお、親水性高分子の脂質誘導体の溶液を構成成分の混合時に加えることによっても、本発明のリポソームが得られる。親水性高分子の脂質誘導体の溶液の添加方法は、いずれのときでも特に問題はないが、構成成分の混合時に添加する方法ではリポソーム内部にも親水性高分子の脂質誘導体が入ることとなり、実質的

な表面修飾率の低下と内封容積の低下を招く場合がある。

【0055】

また、別の方法として、上記の構成成分を混合し、高圧吐出型乳化機により高圧吐出させることにより本発明のリポソームを得ることもできる。

【0056】

本発明のリポソームの投与方法としては、特に限定せず、溶液として静脈投与することなどで行われる。本発明のリポソームは、生体内に投与すると炎症部位や腫瘍部位などのpH酸性の領域に特異的に集積し、他の領域には集積しないことから、抗炎症剤や抗腫瘍剤などの運搬体として適しており、これらの薬剤の効力を効果的に発揮させ、かつ副作用を軽減するなどの効果がある。

【0057】

【実施例】

以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

(実施例1)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩(塩基性化合物)およびミリスチン酸(脂肪酸)を構成成分とするリポソームの調製

(1-①) まず、フォスファチジルコリン 4.62mmol、コレステロール 4.62mmol、3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩 0.76mmolを $\epsilon$ -ブチルアルコール100mlに溶解させた脂質混合溶液を氷浴で凍結し、一晚凍結乾燥を行い脂質混合物を得た。

【0058】

(1-②) (1-①)の手法により得られた脂質混合物0.06mmolを容量50mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14mMのミリスチン酸/クロロホルム溶液を2ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。これに生理食塩水6mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記(1-1)と同様の方法により、平均粒子径が90~200nmで陽荷電脂質に対する陰荷電脂質のモル比が0.5である標記のリポソーム分散液を得た。得られたリポ



ソームの平均粒子径は125.5nmであった。

【0059】

(実施例2)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびホスファチジン酸（リン酸モノエステル誘導体）を構成成分とするリポソームの調製

上記（1-④）の手法により得られた脂質混合物0.06mmolを容量50mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14mMのホスファチジン酸／クロロホルム溶液を0.5ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。これに生理食塩水6mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。以下、上記（1-1）と同様の方法により、平均粒子径が90～200nmで陽荷電脂質に対する陰荷電脂質のモル比が0.125である標記のリポソーム分散液を得た。得られたリポソームの平均粒子径は130.7nmであった。

【0060】

(実施例3)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（塩基性化合物）およびリン酸プレドニゾロンナトリウム（リン酸モノエステル誘導体）を構成成分とするリポソームの調製

上記（1-④）の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに75mMリン酸プレドニゾロンナトリウム水溶液10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リポソーム分散液を得た。これを孔径0.4μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送し、ついで0.2μm、0.1μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送することによって整粒を行った。得られたリポソーム分散液をカラム（Sephacrose 4 Φ3cm X 20cm、溶離液：生理食塩水）にかけてリポソーム画分を回収し、平均粒子径が90～200nmの標記のリポソーム分散液を得た。  
得られたリポソームの平均粒子径は130.7nmであった。

【0061】

(実施例4)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩（塩基性化合物）およびリ

ン酸リボフラビンナトリウムリン酸モノエステル誘導体)を構成成分とするリボソームの調製

上記(1-①)の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに75mMリン酸リボフラビンナトリウム水溶液10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リボソーム分散液を得た。以下、実施例3と同様に操作し、標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は117.9nmであった。

#### 【0062】

##### (比較例1)

上記(1-①)の手法により得られた脂質混合物0.6mmolに生理食塩水10mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リボソーム分散液を得た。これを孔径0.4μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送し、ついで0.2μm、0.1μmのポリカーボネートフィルムを用いて圧送することによって整粒を行い、平均粒子径が90~200nmの標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は110.5nmであった。

#### 【0063】

##### (比較例2)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびホスファチジルグリセロールを構成成分とするリボソームの調製

上記(1-①)の手法により得られた脂質混合物0.06mmolを容量50mlのナス型フラスコにはかり取り、1.14mMのホスファチジルグリセロール/クロロホルム溶液を2ml加えた。クロロホルムを除去した後、一晚真空乾燥することによりフラスコ内壁に脂質薄膜を形成した。これに生理食塩水6mlを加え、55℃で5分間超音波処理することにより、リボソーム分散液を得た。上記(1-1)と同様の方法により、平均粒子径が90~200nmで陽荷電脂質に対する陰荷電脂質のモル比が0.5である標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は138.8nmであった。

#### 【0064】

##### (比較例3)

3,5-ジペンタデシロキシベンズアミジン塩酸塩およびポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体を構成成分とするリボソームの調製 比較例1により得られたリボソーム分散液の脂質濃度を20mMに調整した。このリボソーム分散液にポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン誘導体溶液（分子量約6000、濃度1.214mg/ml）を等容量加えた後60℃で30分加温することによって、平均粒子径が90～200nmで陽荷電脂質に対する陰荷電脂質のモル比が0.13である標記のリボソーム分散液を得た。得られたリボソームの平均粒子径は117.4nmであった。

## 【0065】

（試験例1）各種リボソームのプロテオグリカンとの親和性

この試験の目的は酸性下および中性付近において、リボソームと炎症部位や腫瘍部位などで過剰産生しているプロテオグリカンと親和性を調べたものである。

## 【0066】

（方法）プロテオグリカンに含まれるアニオン性糖鎖高分子であるグリコサミノグリカンを各実施例および各比較例のリボソームと混合したときに、各リボソームに吸着するグリコサミノグリカンの量を測定した。グリコサミノグリカンとしてコンドロイチン硫酸C（分子量：3万～6万）をpH7.4であるリン酸緩衝液に溶解させ0.1mg/mlとなるよう調製し、さらに6N HClによってpH6.0に調整した。得られたpH7.4あるいはpH6.0の0.1mg/mlコンドロイチン硫酸C溶液0.3mlと、脂質濃度を生理食塩水によって10mMに調整した各リボソーム分散液0.3mlを混合し、37℃で1時間加温した。冷却後、10000gで1時間超遠心し、上清を採取した。上清中のコンドロイチン硫酸Cを Blyscan proteoglycan assay kit により定量し、各リボソームへのコンドロイチン硫酸Cの吸着量を算出した。

## 【0067】

（結果）結果を図1に示す。比較例1～3のリボソームは、pH6.0とpH7.4でコンドロイチン硫酸Cの吸着量は同じであった。本発明にかかる実施例1～4のリボソームは、pH6.0とpH7.4ではコンドロイチン硫酸Cの吸着量は差があり、pH7.4においては吸着量が抑えられることが確認された。す

なわち、本発明のリポソームは中性付近ではプロテオグリカンに対する親和性が抑えられるのに対して酸性環境では高い親和性を有することが示された。

#### 【0068】

##### （試験例2）急性毒性

この試験の目的は、本発明のリポソームの毒性が、従来のものの毒性と比較してどの程度であるかを知ることである。そのために、本発明のリポソームのラットに対する致死毒性試験を行った。

#### 【0069】

（方法）実施例1～4のリポソームおよび比較例1～3のリポソーム分散液を限外ろ過膜を用いて濃縮し、さらに必要に応じて注射用滅菌蒸留水で希釈して被験液とした。検疫した5週齢のマウスを1群5匹に区分し、尾静脈より上記の被験液を100ml/kg投与した。一方、溶媒対照群は、生理食塩水を100ml/kg投与した。被験液投与後、7日間にわたって少なくとも1日1回、注意深く一般状態を観察して毒性徴候、死亡状況を記録した。また、7日後に剖検し、各臓器を摘出した。各臓器について病理切片を作成し観察を行った。

#### 【0070】

（結果）本発明のリポソームはいずれも、観察期間中、死亡例を認めなかった。また、7日後の各臓器の病理観察においては、問題となるような病理所見は認められなかった。即ち、本発明のリポソームは、極めて毒性が低く、安全性の高いものであることが確認された。

#### 【0071】

##### 【発明の効果】

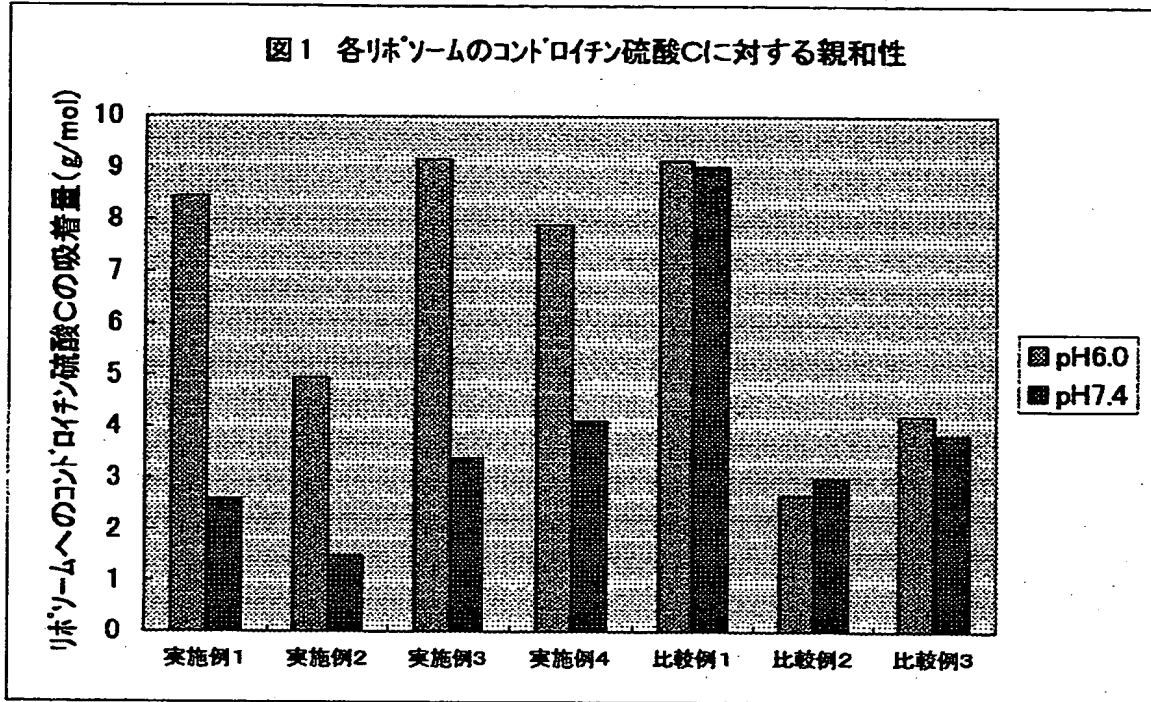
本発明のリポソームは、酸性領域下で炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位へのターゲッティング性が非常に高い。また、安全性も非常に高い。従って、診断および／または治療を目的とする薬物を運搬する本発明のリポソームは、炎症や腫瘍病変を起こした組織および／または臓器における診断及び治療という目的に対して非常に効果的である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 各リポソームとプロテオグリカン（コンドロイチン硫酸C）との親和性を表したグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】薬物を封入し、酸性領域下で炎症部位や腫瘍部位などのpHが低下した標的部位へのターゲティング性が非常に高い薬物運搬体を得る。

【解決課題】構成成分として、①塩基性化合物、②リン酸モノエステル誘導体または脂肪酸である酸性化合物、および③他のリポソーム構成成分からなるリポソームにより達成される。

【選択図】なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000109543]

1. 変更年月日 1990年 8月11日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号  
氏 名 テルモ株式会社